

植物抑菌剂抑菌机理的研究方法进展

李 婷, 周 月, 宋丽雅, 何聪芬

(北京工商大学 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100048)

摘 要:综述了植物抑菌剂作用机理研究中常用的几种技术手段,从植物抑菌剂对微生物细胞形态的影响、对细胞壁、细胞膜、能量代谢和遗传物质的作用等不同方面加以介绍。采用 SEM、TEM、AFM 和 CLSM 方法观察微生物的形态结构;从细胞膜的通透性、流动性、结构变化和内溶物外流 4 个方面检测细胞膜的变化;采用呼吸代谢抑制试验、Clark 氧电极法和荧光猝灭试验方法研究植物抑菌物质对菌体呼吸代谢的影响;论述光谱分析法、电化学方法、核磁共振法、计算机模拟技术手段对抑菌剂与 DNA 的相互作用方式的检测与分析。并对植物抑菌剂抑菌机理的分析方法的发展应用进行了展望。

关键词:抑菌机理;研究方向;分析方法

中图分类号:S 482.2⁺92 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)04-0179-06

植物源抑菌剂作为一类天然安全的抑菌剂,已成为食品、化妆品等领域研究的热点。其对多种病原微生物均有抑制作用,可以延长产品的保质期,来源广泛,具有清除自由基等功效;此外对人体的刺激性小、安全性高,具有较好的开发潜能。但因植物抑菌剂活性成分复杂,抑菌机制尚不完全明确,因此其应用性受到了限制。抑菌机制的深入研究取决于先进的研究方法和技术手段,尽管目前报道的研究抑菌剂作用机制的技术手段已有多种,提出了抑菌活性成分对靶细胞膜的攻击作用模型及细胞内大分子代谢抑制等抑菌机理理论,但是由于每种方法对抑菌作用机制提供的视角有所不同,而抑菌机制的研究往往需要多种技术相结合才能更加全面充分地确定。因而,现对植物抑菌机制研究中常用的方法进行了分类、总结,从植物抑菌剂对微生物细胞形态、细胞壁膜、呼吸代谢和遗传物质等不同方面的作用所涉及的研究方法进行详细介绍,以期天然植物抑菌机制的研究提供一些资料。

1 显微镜观察微生物形态结构

电子显微镜能直接展现微生物形态,进而可视化的确定抑菌剂对微生物细胞的总体作用靶位。目前,最常使用的电子显微镜是扫描电子显微镜(SEM)^[1]和透射电子显微镜(TEM),近几年来,原子力显微镜(AFM)^[2-3]和激光

扫描共聚焦显微镜(CLSM)也被广泛使用。BOOYENS 等^[4]采用 TEM 和 SEM 技术观察大蒜提取物对双歧杆菌的作用机制,SEM 图像显示菌体细胞伸长、扭曲变形,最终为球形;TEM 图像则观察到细胞质固缩,细胞膜完整性被破坏;YOONKYUNG 等^[5]采用 CLSM 观察到一种富含亮氨酸和赖氨酸的抗菌肽的作用靶点在微生物质膜。AFM 和 CLSM 均可描绘出三维图像,而另外 2 种电镜只能得到二维图像;AFM 和 CLSM 可以在大气环境中进行样品测试,但 SEM 和 TEM 的工作环境则必须高真空;CLSM 不仅可以用于观察细胞形态,也可以用于细胞内生化合成分的定量分析、光密度统计以及细胞形态的测量等。课题组总结了 4 种显微镜在抑菌机理研究方面的优缺点,见表 1。

2 研究抑菌剂对细胞壁作用的方法

2.1 细胞壁成分分析

探究抑菌剂对细胞壁的影响,细胞壁的成分变化可作为重要的指标。微生物细胞壁成分主要有肽聚糖、磷壁酸、脂质和蛋白质等。细胞壁作为微生物细胞最外的一层厚实、坚韧的外壁,对微生物的生命活动具有阻拦大分子有害物质进入细胞、与细胞膜一起完成胞内外物质交换、抗渗透压等重要功能。

LPS^[6]即脂多糖,是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分,可以阻止微生物对胆盐和疏水性抗生素的吸附,当细胞处在不利的外界环境中时,该结构对菌体起保护作用。但有研究表明花青素和酚类抗菌物质可使 LPS 破坏而发生渗透作用。

许多研究也表明酚类和萜烯类化合物会作用于细胞壁,导致其通透性增加,胞内的脱氢酶分散出来对细

第一作者简介:李婷(1991-),女,河北唐山人,硕士研究生,研究方向为天然植物抑菌剂。E-mail:qianandeliting@126.com.

责任作者:宋丽雅(1974-),女,博士,副教授,研究方向为微生物与酶工程。E-mail:songly200512@126.com.

基金项目:北京市优秀人才培养 D 类资助项目(2012D005003000006)。

收稿日期:2015-10-08

表 1

细胞形态分析方法优缺点及观察内容比较

Table 1 The advantages and disadvantages of the cell microscope analysis method and the observed contents

检测方法	观察内容	优点	缺点
扫描电镜 SEM(scanning electron microscope)	能观察到微生物细胞表面形态,如细胞拉伸、破损,胞内溶物外泄	制样简单,图像富有立体感;电子束对样品的损伤与污染程度小	适用于研究电子性导体,而 DNA 等生物大分子为非导体,必须用薄金属层包裹起来;由于探针与样品分子的相互作用致使样品分子发生漂移而经常落在视野之外,即可重复性差
透射电镜 TEM(transmission electron microscope)	可对细胞质、细胞膜等内部结构进行分析	高分辨率、高放大倍数	价格昂贵;要求样品的厚度很薄,因此制样复杂;要求条件高,工作环境需高真空
原子力显微镜 AFM(atomic force microscope)	在 SEM 基础上发展起来的一种新颖的物质结构分析法。同样可以观察到细胞表面形态结构的变化;纳米级分辨率	生物大分子样品无需重金属包裹,可以在空气或各种溶剂体系中直接观测,使得生物大分子样品能接近生理环境的条件下直接进行研究;可重复性高;现场操作性好	成像范围太小,扫描速度太慢,受探头影响较大
激光共聚焦扫描显微镜 CLSM(confocal laser scanning microscope)	具有对细胞形态的测量功能,且可以实现长时间活细胞动态观察	具有荧光定量、定位分析及光陷阱技术、细胞间通讯研究,细胞膜流动性测定等功能	最主要的局限在于激发波长有限和时间分辨率不高

胞壁上的脂肪酸产生影响。研究发现单宁可以改变细胞壁饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例,造成在细胞壁脂质层中饱和脂肪酸含量增高,伴随着细胞的生长和磷脂的合成,细胞很快就会代谢失衡、凋亡^[7]。

2.2 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶即 AKP 酶,是存在于细胞壁与细胞膜之间的一种酶,正常情况下在胞外不能检测到其活性。但当细胞壁到破坏后,透性增加,其将泄露到细胞外,因此培养液中 AKP 酶含量变化被用作检测细胞壁完整性的一种常用方法。刘梦茵等^[8]研究乌梅提取物对芽孢杆菌细胞壁的影响,试验显示处理后的胞外 AKP 酶含量较阴性对照有显著差异。

3 研究对细胞膜作用机制的技术手段

细胞膜是维持细胞完整性及保持正常物质能量代

谢的基础。有报道显示,多种植物源防腐剂均可作用于细胞壁和细胞膜体系,直接而迅速破坏依赖于膜结构完整性的能量代谢和细胞及细胞器赖以生存的对物质的选择性透性,使营养物质以及代谢产物无法正常穿过细胞膜,使微生物生长停滞^[9]。AYYALUSAMY等^[10]利用核磁共振、圆二色性和差示扫描量热技术(DSC),研究分别来自于蟾毒素和蜂毒素的 2 种抗菌肽的膜破坏机制;AHMAD 等^[11]采用傅里叶远红外光谱及 DSC 技术观察到抗菌肽能诱导生物膜 PG/PE 脂质混合物分层。李小芳^[12]运用差热-热重和循环伏安法等手段,研究了壳聚糖与模拟细胞膜间的相互作用。结果表明,壳聚糖增加了细胞外膜和内膜的渗透性,壳聚糖中质子化的-NH₃⁺与细胞膜中的 P=O 发生静电作用而破坏了细菌膜的结构和功能,进而使细胞膜的完整性破坏。表 2 从细胞膜

表 2

研究抑菌剂对细胞膜作用的常用分析手段

Table 2 Common analysis methods of effects of antibacterial agent on cell membrane

研究方向	分析方法	简要介绍	文献
细胞膜通透性	Hancock with the membrane-potential-sensitive cyanine dye diSC35	用分光光度计观察在 627、670 nm 波长下荧光水平变化情况	[13]
	电感耦合等离子体原子发射光谱法 ICP-AES (inductive coupled plasma atomic emission spectroscopy)	细胞膜泄露释放的离子检测,如 Zn ²⁺ 、K ⁺	[14]
	膜电位测试法	DiBAC ₄ 具有电压敏感性,极易进入去极化的细胞并与脂类物质结合。细胞膜被破坏的菌体内 DiBAC ₄ 较多,经 LIVE/DEAD 染色后显现红色和绿色,膜完整菌体只显绿色	[14]
	SG 吸收定性试验	Sytox Green 核酸染料只能进入膜破损的细胞,而不能渗入膜完整的细胞,进而膜破损的细胞被标记为绿色荧光	[15-16]
	Energy-and salt-dependent test 能量-离子依赖性试验	菌体与抑菌剂、NaCl、NaN ₃ 一起反应,碘化丙啶染色,流式细胞仪分析细胞膜的完整性	[5]
细胞膜流动性	荧光各向异性测定	有 TMA-DPH 和 DPH 2 种探针,其荧光强度分别反映膜表面和膜内部疏水部分的流动性	[17]
	差示扫描量热仪 DSC(differential scanning calorimeter)	一定的外力作用能使微生物细胞的相关点发生变化。若相关点明显增强,则说明刺激后的细胞膜流动性降低	[11]
	电子自旋共振波谱仪	比较菌体处理前后图谱参数 S 值差异	[18]
细胞膜结构	荧光分析法	蛋白质内源性荧光主要来自于 Trp,荧光变化情况直接反应 Trp 本身及其周围环境的变化,即菌体膜蛋白构象改变	[19]
	固态核磁共振波谱法	可检测到抑菌物质的结构、在细胞膜上的定位及对脂质双分子层的渗透性	[20-21]
	原子力显微镜 AFM(atomic force microscopy)	观察膜结构转换,膜孔形成过程	[22]
	膜孔电导率测定	监测细胞膜双分子层中形成的电压依赖性通道,评估抑菌剂诱导膜孔的形成。抑菌剂附着并穿透双分子层的能力通过分析膜孔电流的电导率来测定	[22]
	模型膜研究法	制备单一或混合脂质模拟细胞膜,评估抑菌剂与磷脂的相互作用,通过 X-射线晶体学,核磁共振光谱及傅立叶变换红外光谱(FTIR),拉曼光谱测定	[23]
细胞内溶物	电导率	胞内离子外泄	[24]
	生化试验	蛋白质、糖、核酸、脂质	[24]
	酶活性	β-半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶、转氨酶等	[25]

通透性、流动性、结构和胞内溶物 4 个方面列举研究植物源抑菌成分对细胞膜作用机制的常用检测方法。

4 研究抑菌剂对微生物呼吸影响的方法

呼吸代谢是生物体进行生命活动的重要表现形式,其实质是细胞内糖的氧化代谢过程,一旦糖的氧化代谢被抑制,供给细胞生命活动所需的能量和合成代谢所需要的碳架及还原力就无法产生,使生物体的生长和繁殖受阻,甚至死亡。评估菌体呼吸代谢的检测方法有呼吸代谢抑制试验、Clark 氧电极法、荧光淬灭和关键酶活测试等。

4.1 呼吸代谢抑制试验

呼吸代谢抑制试验可初步地判断出抑菌物质对呼吸代谢的哪个具体途径起作用。依据与典型抑菌剂的叠加率进行判断,叠加率越小,表明与典型抑制剂间的增效作用越弱,抑制相同代谢途径的可能性就越大。生物体内能量代谢主要有 3 种途径:EMP 途径、TCA 循环和 HMP 途径,其中,碘乙酸、丙二酸和磷酸钠分别是 EMP 途径、TCA 循环和 HMP 途径的典型抑制剂。董周勇等^[26]利用该技术研究石榴皮对金黄色葡萄球菌呼吸代谢的影响,结果表明与磷酸钠的叠加率最大,所以石榴皮提取物对菌体呼吸的抑制最可能是通过抑制 HMP 途径而起作用。

4.2 Clark 氧电极法

Clark Oxygen-electrode Polarography 即 Clark 氧电极法^[27]一般是用来测定水中的溶解氧,属于极谱分析的一种类型。氧电极法可用来测定植物的光合作用、菌体的呼吸作用等过程中氧气的变化情况。该方法具有灵敏度高、反应快、可连续测量记录,能够追踪反应的动态变化过程等特点,所以可采用氧电极法连续监测菌体呼吸代谢过程中氧气的消耗量、变化快慢等情况进而研究影响呼吸代谢的机制。李雪琦^[28]采用 Clark 氧电极法对腐朽菌的呼吸耗氧量变化情况进行测定,借助 Chlorolab-2 型液相氧电极和相关匹配的软件分析比较腐朽菌被中草药制剂作用前后呼吸速率大小的变化,进而研究中草药制剂对木材腐朽菌呼吸代谢的抑制作用。

4.3 荧光淬灭法

氧对一些荧光物质的荧光具有淬灭作用,从而可以降低荧光物质的荧光强度。根据这一原理,可以通过测定荧光物质的荧光维持寿命或强度来测定试样中氧的含量,即氧分子越多,荧光寿命越短,对应强度越低。荧光的强度或寿命与氧气浓度的关系可用 Stern-Volmoer 方程来描述: $I_0/I = r_0/r = 1 + K[Q]$ ^[29-30]。式中, I_0 、 r_0 分别为有氧条件下的荧光强度和寿命; I 、 r 分别为无氧条件下的荧光强度和寿命; $[Q]$ 为溶解氧浓度, K 为 Stern-Volmoer 常数,固定指示剂 K 值一定,通过测定

I_0/I 或 r_0/r 可测定溶解氧的浓度。荧光淬灭法是近年来研究比较活跃的领域,其有不耗氧、无需参比电极、没有电磁场的干扰等优点,但是在用荧光光度法测定过程中荧光剂会出现流失现象,导致测量结果出现偏差,所以要适时补充荧光剂的量。以该方法为主要原理测定溶解氧的光化学传感器正在被研究开发,并应用在工业废水、生活污水等中的溶解氧测量^[31-32],但对检测微生物呼吸代谢中溶解氧变化方面较少。

4.4 测定呼吸和能量代谢关键酶的活性

呼吸代谢过程中所进行的一系列氧化还原反应过程都需要酶的参与,因此抑菌剂对能量代谢的作用机制可以通过呼吸代谢关键酶活性进行检测,琥珀酸脱氢酶(SDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、ATP 酶、 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP}$ 酶和细胞色素氧化酶^[33]等。FAN等^[27]通过测定 SDH 和 MDH 的酶活探究没食子酸中酯(methyl gallate)对青枯病菌呼吸代谢的影响,试验观察到 MG 作用 2 h 后 SDH 活性显著降低,MDH 活性并无太大变化,而 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP}$ 酶活性反而增加。推测可能是因为菌体积极地改变细胞膜内外离子浓度来抵御不利外界环境的影响。

5 研究抑菌剂对遗传物质影响的方法

植物杀菌剂的抑菌机制之一即作用于功能蛋白或遗传物质。药物可使细菌菌体蛋白质发生凝固、变性或减少其合成量,尤其是减少具有某些特定催化作用的酶;而遗传物质具有相对的稳定性,能够精确的自我复制,指导蛋白质合成,控制新陈代谢过程和形状发育,是一切生物细胞的基本成分,对生物体的生长、发育、繁殖、遗传及变异等重大生命现象其起主宰作用。但有研究表明金黄色葡萄球菌在鹿蹄草素的作用下,菌内转肽酶 femB 基因转录为 mRNA 过程受到抑制,femB 酶的翻译表达量降低,干扰肽聚糖的合成,最终导致菌体细胞的细胞壁的正常合成受阻^[34]。

植物抑菌剂与 DNA 的相互作用方式有静电结合作用^[35]、扦插作用^[36]和沟槽结合^[37]等。药物分子与 DNA 相互作用的研究方法通常有电化学分析方法、光谱法、粘度法等。

5.1 光谱学分析法

光谱学方法包括紫外吸收光谱法、荧光光谱法、圆二色谱法、红外光谱法和激光拉曼法等。它们共同的特点是通过抑菌物质与 DNA 相互作用后引起体系光学性质的改变来推测二者相互作用的信息。欧植择等^[38]利用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱等方法研究了色胺修饰竹红菌素与小牛胸腺 DNA 的相互作用,发现色胺基团采用外部堆积作用方式结合;而竹红菌素基团采用非特异性作用方式与碱基或糖-磷酸骨架结合。使用光谱学方法检测具有成本低、速度快和现象明显等

优点,但同样也存在不足之处,由光谱学得到的红移、紫移、增色、减色效果都属于现象学的信息,它们虽然能给出药物与 DNA 的结合状态,但无法给出相互作用的精确信息,比如结合的位点、在大沟结合还是在小沟结合等,因此,光谱学方法最大的用处是对相互租用模式的初步判断以及对其它方法所得结果的确认等。

5.2 电化学方法

电化学方法主要是利用电能与化学能之间的相互作用以及转化过程中的有关规律来获得某些相互作用信息,它包括电导分析、电位分析、库伦分析、极谱分析和伏安法等。在研究小分子与核酸的相互作用中,虽然电化学方法在一定程度上受分子电活性的限制,但对于一些吸收光谱比较弱,或与核酸作用前后光谱无明显变化,而无法用光谱手段来研究的分子,却有可能用直接或间接伏安法进行研究。其中,循环伏安法在生物无机化学中的应用较多。若抑菌物质与 DNA 分子之间发生键合作用,则循环伏安曲线将发生明显的变化,即氧化还原峰电流强度及个数改变。LIN等^[39]依据循环伏安图像证明铜聚合物导致大肠杆菌 DNA 发生强的裂解行为。

5.3 核磁共振分析法

核磁共振(NMR)分析法可以定量确定结合位点的化学变化,并且对长距离弛豫效应更为准确。NMR 中的 SAR 是最早报道的用 NMR 方法筛选靶向 RNA 小分

子的方法,并且可以通过靶向蛋白质的二维¹H-¹⁵N 光谱筛选附近亚结合位点的小分子物质^[40]。席小莉^[41]采用二维核磁共振研究钴配合物与十聚错配 DNA 的作用;ZHOU等^[42]的 NMR 研究结果证明抗癌药物以嵌插方式与寡聚核苷酸作用。随着软电离技术的发展,质谱法在小分子与 DNA 相互作用的结构分析中发挥着独特的作用^[43],该方法能灵敏快速地获得小分子与 DNA 作用的结合区域、结合位点数、亲和力以及非共价键结合方式等信息。

5.4 计算机模拟技术

借助分子模拟技术和分子图形软件,可直接观察药物与 DNA 在分子级别上的相互作用。李涛等^[44]采用 Hyperchem 软件利用分子动力学和几何优化法模拟药物与 DNA 在理想状态下的相互作用;ERIKA等^[45]研究 Buforin II 与 DNA 结合方式,建立分子模型并用 MM-GBSA 方法计算其相互作用时氢键及系统能量,最后需进行试验验证如采用荧光嵌插置换试验(FID)、CD 等。但该方法对研究人员有较高的要求,其必须具有熟练使用计算机模拟软件及正确分析药物作用模式的能力。

对于抑菌剂对遗传物质作用机制的分析方法并不局限于一种,大多时候都需要采用多种分析方法同时进行鉴定^[46-48]。表 3 列举了一些其它检测方法及其优缺点。

表 3 其它检测方法介绍及优缺点

Table 3 Brief introduction of the advantages and disadvantages of other analysis methods

分析方向	检测方法	简要介绍	优缺点	文献
蛋白质水平	SDS-PAGE	蛋白质含量和裂解检测	可进行直观性比较;但有一定毒性	[49]
	双向电泳	细胞表达蛋白含量和种类的差异	可将上千种不同蛋白质分离,后接一系列自动化操控可对蛋白质进行分析、鉴定;但实验操作繁琐,重现性差。所需要的仪器设备较昂贵	[28]
核酸水平	DAPI 荧光染色法	在荧光显微镜下,DNA/RNA 断裂图像清晰可见,用 SPSS 和 Excel 软件可对 DNA/RNA 含量进行差异性显著性 <i>t</i> 检验	能对 DNA/RNA 含量差异进行定量分析	[50]
	ERIC-PCR 基因组内重复一致序列-聚合酶链式反应	比较抑菌物质处理前后微生物的 DNA/RNA 指纹图谱变化	简捷、快速、结果稳定、分辨率高,且产生的再现指纹比随意利用引用的 PCR 技术要多	[51]
	qPCR (Quantitative real-time)		灵敏度高、特异性强、线性关系好、操作简便,无污染	[52]
基因调控水平	实时定量 PCR	抑菌剂对菌体与生命活动相关的基因如 <i>cfa</i> 、 <i>ompC</i> 、 <i>hdeA</i> 、 <i>osmY</i> 等表达的调控作用	具有高通量、多因素、微型化、快速、灵敏的特点,但容易出现假阳性	[53-54]
	DNA Microarrays 基因芯片			
拓扑异构酶 I/II	凝胶电泳实验	抑菌剂对 PBR322 DNA 直接作用,通过凝胶电泳实验比较线性 DNA 与螺旋状 DNA 量的变化,从而反应酶活性	操作简便,重复性好	[50]
DNA 聚合酶	生物发光技术	DNA 聚合酶所催化的反应会产生定量的焦磷酸,利用 ATP 硫酸化酶将焦磷酸定量转化成 ATP,然后利用萤火虫荧光素酶系统检测 ATP,从而确定 DNA 聚合酶的活性	操作简便、快速且灵敏度高	[55]

6 问题与展望

人类对于抑菌剂作用机制的研究还处于初级阶段,许多抑菌剂的作用位点、进入途径、对微生物的作用及影响等问题还需进一步地系统研究,而这些问题的解决又有待于抑菌机理研究方法的改善和提高。其中,人们对于细胞膜和 DNA 作用机制的研究较深入、技术手段

也较多,而对于细胞壁和呼吸代谢的影响只能推测抑菌剂作用的大体部位,不能确定抑菌、杀菌物质作用的具体靶位点,原因之一就是分析技术和方法的限制。因此必须开发、利用新的科技手段,加强对微生物细胞壁和能量代谢等方向的研究。

除此之外,针对上述测定方法的各种不足,研究者

也正在原有基础上开发一些新的方法或对新方法加以改进,以求更加准确、快捷地检测分析。另外,将医学领域有关药物抑菌抗癌机制研究的技术手段及物理、化学分析等其它领域的分析方法综合运用到植物抑菌机制的研究中,不仅为抑菌机理研究提供新的途径和思路,而且对于进一步开发高效的植物源抑菌剂也具有十分积极的作用。相信随着社会的进步,科技快速发展,人类会开发出具有更高灵敏度、更方便、快捷的抑菌机理研究新方法。

参考文献

- [1] LI Y Q, HAN Q, FENG J L, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of 3-poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2014, 43: 22-27.
- [2] ALEXANDRA C R, DEBORA A C, EDUARDO M C, et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90: 270-274.
- [3] BAPTISTE L, MATHIEU L, JOE S, et al. Structure and mechanism of action of a *de novo* antimicrobial detergent-like peptide[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1808: 106-116.
- [4] BOOYENS J, LABUSCHANGNE M C, THANTSHA M S. *In vitro* antibacterial mechanism of action of crude garlic (*Allium sativum*) clove extract on selected probiotic bifidobacterium species as revealed by SEM, TEM, and SDS-PAGE analysis [J]. Springer Science, 2013, 6(2): 82-87.
- [5] YOONKYUNG P, DONG G L, SEUNG H J, et al. A leu-lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2003, 1645: 172-182.
- [6] 陈燕, 孙晓红, 曹奕, 等. 蓝莓抑菌活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2013(25): 716-721.
- [7] 刘秀丽. 植物缩合单宁对大肠杆菌的抑制作用及抑菌机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013: 59-60.
- [8] 刘梦茵, 刘芳, 周涛, 等. 物美提取物对蜡状芽孢杆菌的抑菌机理研究[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 103-105.
- [9] 陈佳佳, 廖森泰, 刘凡, 等. 中草药抑菌活性成分研究进展[J]. 中草药, 2011, 34(8): 1313-1317.
- [10] AYYALUSAMY R, SATHLAH T, DONG K L, et al. Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-594 derived from magainin 2 and melittin[J]. Biophysical Journal, 2006, 91: 206-216.
- [11] AHMAD A, MARGITTA D, ALFRED B. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: a mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes? [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1788(3): 650-659.
- [12] 李小芳. 壳聚糖抑菌活性及机理研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009: 16-17.
- [13] FE H, YANG Y, YANG G, et al. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* Ho₃[J]. Food Control, 2010, 21: 1257-1262.
- [14] LI K, XIE Y T, HUANG L P. Antibacterial mechanism of plasma sprayed Ca₂ZnSi₂O₇ coating against *Escherichia coli* [J]. Mater Med, 2013(24): 171-178.
- [15] MUNOZ A, LONPCE G B, MARCOS J F. Studies on the mode of action of the antifungal hexapeptide PAF26[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(11): 3847-3855.
- [16] VANDER W L, LAY F T, ANDERSON M A. The plant defension, NaD1, enters the cytoplasm of fusarium oxysporum hyphase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(21): 14445-14452.
- [17] JORDANE J, CATHERINE C G, MOHAMED Y, et al. Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 81: 339-347.
- [18] 邢雷, 杨淑娟, 任淑萍, 等. 高糖对细胞膜流动性的影响[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 362-365.
- [19] 李俊森. 10-HAD 对 G⁺ 抑菌活性及机制的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2014: 27-28.
- [20] KIM C, WI S A. Solid-state NMR study of the kinetics of the activity of an antimicrobial peptide, PG-1 on lipid membranes[J]. Bull Korean Chem Soc, 2012, 33(2): 206-216.
- [21] SU Y, LI S, HONG M. cationic membrane peptides: atomic-level insight of structure-activity relationships from solid-state NMR[J]. Amino Acids, 2013, 44(3): 821-833.
- [22] KIN L H, HAO W, TING A S. Mechanism of structural transformations induced by antimicrobial peptides in lipid membranes[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2012, 1818: 194-204.
- [23] 苗建银, 柯畅, 郭浩. 抗菌肽的提取分离及抑菌机理研究进展[J]. 现代食品科技, 2014, 1(30): 233-240.
- [24] DIAO W R, HU Q P, ZHANG H, et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill)[J]. Food Control, 2014, 35: 109-116.
- [25] VIVEK K B, AJAY S, KWANG H B. Antibacterial mode of action of cudrania tricuspidata fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens[J]. Food Control, 2013, 32: 582-590.
- [26] 董周永, 刘兴华, 赵国建, 等. 石榴皮对金黄色葡萄球菌的抑菌机理研究[C]. 2010 First International Conference on Cellular, Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering (CMBB), 2010: 10-14.
- [27] FAN W W, YUAN G Q, LIN W, et al. Antibacterial mechanisms of methyl gallate against *Ralstonia solanacearum*[J]. Australasian Plant Pathol, 2014, 43(1): 1-7.
- [28] 李雪琦. 中草药防止木材腐朽的抑菌机理研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012: 57-58.
- [29] SANG K, ICHIRO O. Optical sensor for oxygen using a porphyrindoped solgel glass[J]. Analyst, 1997, 122(1): 81-84.
- [30] RUBY G N, GREGRPRY B L, CORY R, et al. fiber-optic oxygen sensor using molybdenum chloride cluster luminescence[J]. Applied Physics Letters, 1999, 75(19): 2885-2887.
- [31] 张建标, 陈兴, 黄俊, 等. 一种可用于溶解氧测定的光纤氧传感器[J]. 传感器技术, 2002, 21(10): 4-7.
- [32] 吕太平, 陈世光, 乔晓蓉, 等. 荧光熄灭型光纤氧传感器测定水中溶解氧[J]. 化学传感器, 2002, 22(4): 38-44.
- [33] BHUPINDER P K, DUNCAN B, PHILIP J, et al. Mode of action and pesticidal activity of the natural dumione and of some analogues[J]. Pest Management Science, 2003, 59: 174-184.
- [34] 于庆华. 鹿蹄草素对金黄色葡萄球菌抑菌作用及其机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007: 23-25.
- [35] WU H, JIA F, KOU F, et al. A schiff base N - (2 -

hydroxylacetophenone)-3-oxapentane-1,5-diamine and its copper(II) coordination polymer: synthesis, crystal structure, antioxidation, and DNA-binding properties[J]. Journal of Coordination Chemistry, 2011, 64(20): 3454-3464.

[36] GAO E, SHI Q, LIN L, et al. DNA binding studies of complex ((cu(phen)(py)-(H₂O)₂H₂O))[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2009, 27(12): 2341-2346.

[37] LI Y T, LIU Z Q, WU Z Y. One-dimensional copper(II) coordination polymers bridged both by trans-oxamid-ates and phenyldicarboxylates: Synthesis, crystal structure and DNA binding studies[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2008, 102(9): 1790-1797.

[38] 欧植择, 陈晨, 高云燕, 等. 色胺修饰竹红菌素及其稀土离子配位聚合物与 DNA 相互作用研究[J]. 影像科学与光化学, 2013, 31(5): 361-374.

[39] LIN X, LI X, ZHANG Z J, et al. Studies on antibacterial mechanisms of copper complexes with 1,10-phenanthroline and amino acid on *Escherichia coli*[J]. Bio Trace Res, 2013, 154: 150-155.

[40] 殷玉和, 王颖, 傅学奇. 靶向 RNA 药物检测和筛选的生物物理学方法[J]. 生命的化学, 2001, 21(3): 234-236.

[41] 席小莉. 生物小分子与 DNA 相互作用的光谱及二维核磁的研究[D]. 太原: 山西大学, 2008: 113-136.

[42] ZHOU N, JAMES T L, SHAFER R H. Binding of actinomycin D to (d(GATATC))₂: -NMR evidence of multiple complexes[J]. Biochemistry, 1989, 28(12): 5231-5239.

[43] ROSU F, de PAUW F, GUITTAT L, et al. Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes: an equilibrium dialysis and electrospray ionization mass spectrometry analysis[J]. Biochemistry, 2003, 42(35): 10361-10371.

[44] 李涛, 吴晓军, 梁峰, 等. 对甲苯磺酰基-3-羟基-1,5,8-三氮杂环癸烷的合成及与 DNA 的相互作用研究[J]. 有机化学, 2011, 31(1): 101-105.

[45] ERIKA T U, CHASE H B, DANETTE K, et al. Investigating the nucleic acid interactions and antimicrobial mechanism of buforin II[J]. FEBS Letters, 2008(12): 1715-1718.

[46] DIPEN P S, ZHANG Z G, ARKADY B H. The association of DNA damage response and nucleotide level modulation with the antibacterial mechanism of the anti-folate drug Trimethoprim [J]. BMC Genomics, 2011 (12): 583-597.

[47] DAVID A S, WOOK C, FRESHTEH T, et al. toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74: 176-185.

[48] VIVIAN C. H, QIU X J, BENILDO G R, et al. Application of cranberry concentrate (*Vaccinium macrocarpon*) to control *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef and its antimicrobial mechanism related to the downregulated *slp*, *deA* and *cfa*[J]. Food Microbiology, 2009, 26(1): 32-38.

[49] MOTOKAZU N, NAOFUMI S, TAKASHI T, et al. Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 [J]. Food Control, 2012 (25): 225-232.

[50] WANG Q, WANG H T, XIE M J. antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus* [J]. Arch Microbiol, 2010, 192: 893-898.

[51] 刘博婷. ERIC-PCR 的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(8): 49-51.

[52] CHEN C X, HU J, ZHANG S Z, et al. Molecular mechanisms of antibacterial and antitumor actions of designed surfactant-like peptides[J]. Biomaterials, 2012, 33: 592-603.

[53] DAVID A S, WOOK C, FRESHTEH T, et al. Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74: 176-185.

[54] MICHAEL A K, DANIEL J D, BORIS H, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics[J]. Cell, 2007, 130: 797-810.

[55] 宁勇, 姚群峰. 应用生物发光技术检测 DNA 聚合酶活性[J]. 临床输血与检测, 2005, 7(1): 25-26.

Research Progress in Methods of Antibacterial Mechanism of Plant Bacteriostat

LI Ting, ZHOU Yue, SONG Liya, HE Congfen

(Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

Abstract: Some common antibacterial mechanism methods of plant bacteriostat were discussed in this paper, which introduced the influences on microbial cell morphology, cell membrane, cell wall, cellular respiration metabolism as well as the genetic material. The methods of SEM, TEM, AFM and CLSM observing microbial morphology were applied; the detection methods were illustrated in the four aspects of cell membrane structure, permeability, liquidity and the flow of solute; the respiratory metabolism inhibition test, Clark oxygen electrode method and fluorescence quenching test method were used to study the influence of plant bacteriostat on respiratory metabolism; spectral analysis method, electrochemical method, nuclear magnetic resonance (NMR) method, computer simulation technology were used to detected the interactions between antibacterial agent and DNA. This article mainly reviewed the current methods and means on various microbial structures, and evaluated briefly. Problems and prospects of the research and development of antibacterial mechanism methods were also presented.

Keywords: antibacterial mechanism; research direction; analytical method